

P-9 如何检测 β -半乳糖苷酶

. 概述

从大肠杆菌中提取的 β -半乳糖苷酶基因被广泛用作检测报告基因的标记物。虽然X-gal是检测细胞或组织中 β -半乳糖苷酶的常用试剂，但由于X-gal细胞通透性差，需要固定细胞或组织，而且目前已开发的荧光检测试剂由于在细胞中的停留性差，不能明确区分 β -半乳糖苷酶表达的细胞和未表达的细胞。

为了解决这些问题，Urano, Kamiya等成功开发了SPiDER- β Gal，SPiDER- β Gal具有理想的穿透细胞膜并停留在细胞内的能力。

SPiDER- β Gal在 β -半乳糖苷酶的酶促反应下迅速生成醌甲基化物，该产物是一种亲电子化合物，可以和带有-SH等亲核功能基团的蛋白质结合产生荧光。由于SPiDER- β Gal可以自我固定在细胞内的蛋白质上而停留在细胞内，因此可以进行单细胞分析。

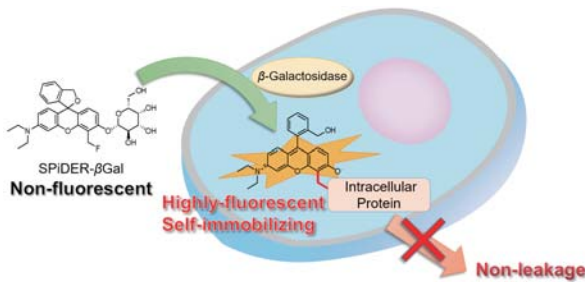


图1. SPiDER- β Gal的反应机理

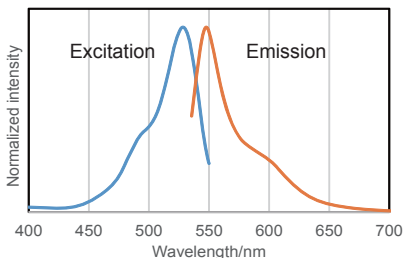


图2. SPiDER- β Gal和 β -半乳糖苷酶的反应产物的激发和发射光谱图

推荐波长：
Ex：500 ~ 540 nm
Em：530 ~ 570 nm
用共聚焦显微镜或流式细胞仪请选择488 nm激发波长

. 试剂内含

SPiDER- β Gal 20 μ g \times 3

. 储存条件

0-5 $^{\circ}$ C，避光保存

. 所需的设备和材料

- 二甲基亚砷 (DMSO)
- Hanks 'HEPES缓冲液
- 微量管
- 移液器

. 溶液配制

配制1 mmol/l的SPiDER- β Gal DMSO储存液

加入35 μ l的DMSO至SPiDER- β Gal (20 μ g) 管子中并用吸管移液器吹打溶解。

*SPiDER- β Gal储存液保存于-20 $^{\circ}$ C。

配制1 μ mol/l的SPiDER- β Gal工作液

用Hanks 'HEPES缓冲液稀释SPiDER- β Gal储存液，配制成1 μ mol/l的SPiDER- β Gal工作液。

*为了维持细胞的状态，推荐使用Hanks 'HEPES缓冲液。

. 染色步骤

SPiDER- β Gal染色

1. 制备细胞悬液。
2. 去除培养基，用Hanks 'HEPES缓冲液洗涤细胞2次。
3. 加入适量SPiDER- β Gal工作液。
4. 在37 $^{\circ}$ C培养15 min。
5. 用荧光显微镜或流式细胞仪观察细胞。

*染色后即使不洗涤细胞也可以观察。但是如果您需要也可以洗涤细胞。

. 实验例

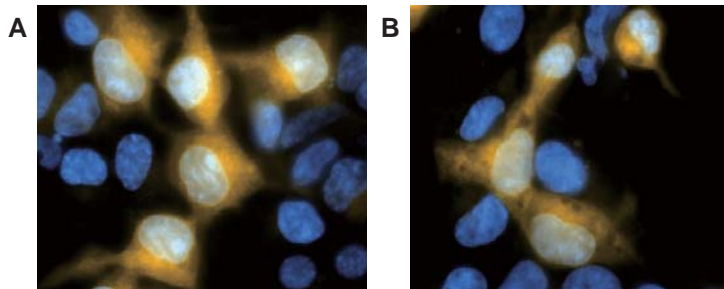
用荧光显微镜检测 β -半乳糖苷酶表达的细胞

1. 在含有DMEM培养基 (10%胎牛血清，1%青霉素-链霉素) 的35 mm培养皿中接种500 μ l的HEK细胞 (5×10^5 个/ml) 和500 μ l的HEK/LacZ细胞 (5×10^5 个/ml)，在5% CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱中过夜培养。
2. 用2 ml的Hanks 'HEPES缓冲液洗涤细胞2次。
3. 向培养皿中加入2 ml的SPiDER- β Gal工作液，然后在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养15 min。
4. 去除上清液后，用2 ml的Hanks 'HEPES缓冲液洗涤细胞2次。
5. 再加入2 ml的Hanks 'HEPES缓冲液，在荧光显微镜下观察细胞。(图3.A)
6. 去除上清液后，向培养皿中加入2 ml的4%多聚甲醛 (PFA) /PBS溶液，在室温下培养15 min。
7. 去除4%多聚甲醛/PBS溶液后，用2 ml的Hanks 'HEPES缓冲液洗涤细胞2次。
8. 再加入2 ml的Hanks 'HEPES缓冲液，在荧光显微镜下观察细胞。(图3.B)

P-9 如何检测 β -半乳糖苷酶

滤光器 (波长/带通滤波器)

荧光成像 : 550/25 nm (Ex), 605/70 nm (Em)



A : 活细胞 ;
B : 固定细胞 (4%PFA/PBS)
(黄色 : SPiDER- β Gal ;
蓝色 : Hoechst 33342)
 β -半乳糖苷酶表达的HEK/LacZ
细胞荧光成像清晰, 而且固定
细胞与活细胞的检测结果一致。

图3. HEK/LacZ细胞和HEK细胞1:1比例的荧光成像

用流式细胞仪检测 β -半乳糖苷酶表达的细胞

1. 在微型管中混合500 μ l的HEK细胞 (5×10^5 个/ml) 和500 μ l的HEK/LacZ细胞 (5×10^5 个/ml)。
2. 向微型管中加入1 μ l的SPiDER- β Gal DMSO 储存液, 在37 $^{\circ}$ C 培养15 min。
3. 用流式细胞仪分析细胞 (488 nm激发波长, 530/30 nm带通滤波器)。

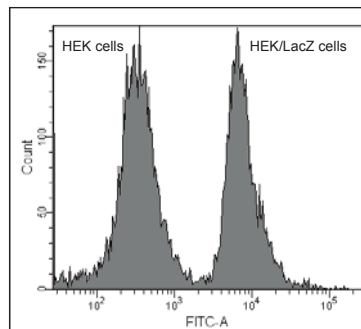


图4. HEK/LacZ细胞和HEK细胞1:1比例的流式细胞仪分析
在流式细胞仪分析图中, β -半乳糖苷酶表达的
HEK/LacZ 细胞和HEK细胞可以明显区分。

参考文献

1. Jiabin Zhao, *et al.*, Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice, *The Journal of Biological Chemistry*, **2018**, 293(5), 1596-1609
2. Yuko Nakamura, *et al.*, A topically-sprayable, activatable fluorescent and retaining probe, SPiDER- β Gal for detecting cancer; Advantages of anchoring to cellular proteins after activation, *Oncotarget*, **2017**, 8(24), 39512-39521
3. T. Sugizaki, *et al.*, Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality, *Nature Partner Journal: Aging and Mechanisms of Disease*, **2017**, 3, 12
4. Shun Lu, *et al.*, Developmental vascular remodeling defects and postnatal kidney failure in mice lacking Gpr116 (Adgrf5) and E1td1 (Adgrl4), *PLoS ONE*, **2017**, 12(8), e0183166
5. Tomohiro Doura, *et al.*, Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution, *Angewandte Chemie International Edition*, **2016**, 55(33), 9620-4